

Untersuchungen
über den Desoxyribonukleinsäuregehalt
in Leukämiezellen unter dem Einfluß der Therapie

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Werner Merz
aus Stuttgart - Bad Cannstatt

1967

9100

LANE MEDICAL LIBRARY OF
STANFORD UNIVERSITY
300 PASTEUR
PALO ALTO, CALIFORNIA



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen

Direktor: Professor Dr. med. H. E. Bock

Untersuchungen
über den Desoxyribonukleinsäuregehalt
in Leukämiezellen unter dem Einfluß der Therapie

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Werner Merz
aus Stuttgart - Bad Cannstatt

1967

Dekan: Professor Dr. F. Lembeck

1. Berichterstatter: Professor Dr. H.E. Bock

MEINEN ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Einleitung	1
Kasuistik	3
Methodik	8
a) Apperativer Aufbau	8
b) Färbetechnik	9
c) Fehlerdiskussion	9
d) Auswertung	11
Ergebnisse	12
Diskussion	38
Zusammenfassung	41
Literaturverzeichnis	43
Lebenslauf	

EINLEITUNG

Der Desoxyribonukleinsäure (DNS) kommt für die Übermittlung genetischer Informationen eine große Bedeutung zu (16, 27). Untersuchungen an haploiden Spermien und diploiden Somazellen ergaben, daß der DNS-Gehalt der ruhenden Zellen bei verschiedenen Tierarten eng mit der Chromosomenzahl korreliert ist (17 - 21). Bei ein und derselben Spezies ist der DNS-Gehalt in der Einzelzelle konstant. Erst kurz vor der Mitose kommt es innerhalb der DNS-Synthesephase zu einer Verdoppelung der DNS. Bei dieser im ganzen Tierreich vorhandenen Konstanz des DNS-Gehaltes in der normalen Somazelle, kommt der Erhöhung des DNS-Gehalts in Tumorzellen (1 - 4) bei verschiedenen Neoplasien wie auch in Leukämiezellen eine besondere Bedeutung zu. Die Vermehrung der Kern-DNS kann unter einer zytostatischen Behandlung zurückgehen (22 - 26).

Die Aussage biochemischer Untersuchungen bezieht sich jedoch auf ein ganzes Zellkollektiv. So kann eine Zunahme der in prämitotischer DNS-Synthesephase befindlichen Zellen mit einem höheren DNS-Gehalt eine Zunahme in allen Zellen vortäuschen. Erst quantitative zytophotometrische Untersuchungen (15) können die Ursache einer am Zellkollektiv gefundenen DNS-Veränderung klären.

Die in der Literatur mitgeteilten quantitativen cytochemischen Untersuchungen an Leukämien (5 - 14) beziehen sich jeweils nur auf wenige Fälle und sind zum Teil noch an eine einfache (und dadurch mit relativ hohem Meßfehler behaftete) photometrische Technik gebunden. Deshalb ist es gerechtfertigt, über Untersuchungen an unreifzelligen Leukämien zu berichten, die mit dem neuen Zytophotometer UMSP I (Fa. K. Zeiss) durchgeführt wurden, das eine sehr große Meßgenauigkeit ermöglicht.

Diese Untersuchungen an unreifzelligen Leukämien sollen zur Beantwortung folgender Fragen beitragen:

- 1) Ist der DNS-Gehalt der Paraleukoblasten wie der DNS-Gehalt normaler Somazellen diploid, oder zeigt er mehr oder minder starke Abweichungen, wie man es auf Grund von Chromosomenuntersuchungen (33 - 36) mit dem Nachweis aneuploider Stammlinien vermuten könnte?
- 2) Wie hoch ist der Prozentsatz der Paraleukoblasten, der sich auf Grund seines höheren DNS-Gehaltes in der DNS-Verdopplungsphase befindet?
- 3) Treten unter der Therapie mit Steroiden oder Antimetaboliten Änderungen im DNS-Gehalt der Paraleukoblasten auf und kommt es unter der Behandlung zum Auftreten neuer Zellpopulationen mit verändertem DNS-Gehalt? Zeigen dabei Nebennierenrindensteroid, Puri-Nethol und Methotrexat einen unterschiedlichen Effekt?
- 4) Ändert sich unter der Behandlung mit Steroiden oder Antimetaboliten der Prozentsatz der in DNS-Synthese befindlichen Paraleukoblasten?

KASUISTIK

Wir führten quantitative, feulgenphotometrische DNS-Untersuchungen unter der Therapie bei 10 Kranken mit einer Paraleukoblastenleukämie und 2 Kranken mit einem Myeloblastenschub bei chronisch myeloischer Leukämie durch. Auf die klinische Behandlung wird bei der Besprechung der Ergebnisse ausführlich eingegangen. Die Aufnahmebefunde sind in Tabelle 1 a - c zusammengestellt.

- 1) Br. B., 51 Jahre, ♂: 6 Wochen vor der Klinikaufnahme fühlte sich der Patient müde und abgeschlagen; er klagte über starke Kopfschmerzen. Kurze Zeit später traten erhöhte Temperaturen und Schüttelfrost auf; und der Kranke bemerkte Lymphknotenschwellungen am Hals und Unterkiefer. Bei einer Zahnextraktion blutete es ungewöhnlich stark nach; 3 Tage vor der Klinikeinweisung fand sich frisches Blut im Stuhl.
- 2) Fi. L., 49 Jahre, ♀: Früher seien bei der Patientin ab und zu Anginen aufgetreten, sonst sei sie aber immer gesund gewesen. Weil eine Zahnextraktionswunde nach 2 Tagen immer noch stark nachblutete, fertigte der Hausarzt einen Blutausschuss an. Er wies dann die Patientin mit der Verdachtsdiagnose Leukämie in die Klinik ein.
- 3) Ge. L., 42 Jahre, ♀: 4 Wochen vor der Krankenhausaufnahme war die Regelblutung bei der Patientin verstärkt; seit dieser Zeit war sie appetitlos und abgeschlagen. Nach 2 Wochen traten Temperaturen um 39°C auf; weiterhin kam es zu Zahnfleischblutungen und zu einer Stomatitis. Kurz vor der Einweisung durch den Hausarzt fanden sich flächenhafte Blutungen unter den Armen.
- 4) He. G., 15 Jahre, ♂: Der Patient verspürte seit einigen Monaten vermehrten Durst, seit mehreren Wochen Müdigkeit. 5 Tage vor der Klinikaufnahme klagte er über heftige Kopfschmerzen, sowie über Druck- und Schmerzempfindungen im Oberbauch. Einen Tag später traten am ganzen Körper teils stecknadelkopfgroße, teils flächenhafte Blutungen auf. Einen Tag vor der Krankenhauseinweisung kam es zu massivem Bluterbrechen.
- 5) Ka. P., 55 Jahre, ♀: In den letzten Monaten war es zur Gewichtsabnahme gekommen. 8 Tage vor der Aufnahme trat nach einem Sturz so heftiges Nasenbluten auf, daß die Patientin die HNO-Klinik zur Tamponade aufsuchen mußte. Dort wurde ein Blutbild angefertigt und daraufhin die Überweisung in die Med. Klinik veranlaßt.

6) Kl. F., 48 Jahre, ♂: Seit 6 Monaten fühlte sich der Patient müde und abgeschlagen; in dieser Zeit hatte er 17 kg an Gewicht abgenommen. 2 Monate später wurde in einer auswärtigen Klinik die Diagnose einer Leukämie gestellt und mit 40 mg/d Methylprednisolon behandelt. Dann erfolgte die Verlegung in die Med. Klinik.

7) Kr. B., 52 Jahre, ♀: Die Patientin war seit 6 Wochen dauernd müde. Kurze Zeit später traten Temperaturen bis 38,5°C auf. Die Kranke wurde appetitlos und der Umgebung fiel eine zunehmende Blässe auf. Kurz vor der Klinikeinweisung entwickelte sich ein Zahnabszeß.

8) Kr. W., 30 Jahre, ♂: 3 Monate vor der Ersteinweisung hatte der Patient mehrfach Temperaturanstiege bis 39°C und war müde und appetitlos. Kurz vor Aufnahme in die Med. Klinik traten Hautblutungen an beiden Beinen auf. Nach Diagnosestellung einer Leukämie und mehrmonatiger Klinikbehandlung in der Med. Klinik kam es zu einer Vollremission, die unter Dauermedikation von 100 mg Puri-Nethol und 12,5 mg Prednisolon fast eineinhalb Jahre andauerte. Die erneute Einweisung erfolgte wegen eines zunehmenden Ikterus.

9) Mü. R., 27 Jahre, ♂: Auch bei diesem Kranken traten 4 Wochen vor der Klinikaufnahme Temperaturen bis 39°C auf. Er klagte über Mattigkeit, Abgeschlagenheit, Appetitlosigkeit sowie über Schmerzen im Brustbereich. Gleichzeitig nahm er an Gewicht ab und der Umgebung fiel eine zunehmende Blässe auf.

10) Sch. K.H., 24 Jahre, ♂: 2 Monate vor der Erstaufnahme fühlte sich der Patient müde und schlapp. Er verspürte Schmerzen in der rechten Hüfte, die in das Bein ausstrahlten. Bei einem Schmerzanfall wurde der Hausarzt aufgesucht, der eine Milz- und Lebervergrößerung feststellte, sowie eine Leukozytenzahl von über 100 000 im peripheren Blut. Daraufhin erfolgte die Klinikeinweisung.

11) Sch. L., 54 Jahre, ♀: Schon ein halbes Jahr vor der Aufnahme klagte die Patientin über zunehmende Müdigkeit und Abgeschlagenheit. Der Zustand verschlechterte sich zusehends. Jetzt erfolgte auf eigenes Drängen der Patientin die Klinikeinweisung.

12) Wi. S., 14 Jahre, ♂: Bei dem Patient stellte sich 2 Monate vor der Klinikaufnahme Müdigkeit und Abgeschlagenheit ein; dabei fiel eine zunehmende Blässe auf. Einen Monat später wurde er appetitlos und klagte über Kopf- und Leibschmerzen. 10 Tage vor der Einweisung traten Temperaturen um 38°C, Halsschmerzen sowie Lymphknotenschwellungen am Hals auf. Gleichzeitig kam es zu Zahnfleischbluten. Im Stuhl fand sich frisches Blut.

Name	Allgemeinbefund	Leber	Milz	Lymphknoten	Leuko u. Hb.	Ery. Thrombo	Zellzahl u. % Blasten im STP	Krankheitsdauer nach d. Aufnahme
					gr%	Mill.		

Br. B.	Blässe, red. A. Z. Purpura an den Unterschenkeln	nicht tastbar	nicht tastbar	submandibul. re. jugulär und axillär	128 000 88 %	10, 9 3, 3	173 000 92 %	verstarb nach 7 Tagen, keine Besserung.
51 J.	Blut im Stuhl Erstsympt. vor 6 Wochen.							

Fi. L.	Blässe, red. A. Z. Hämatome an den Unterschenkeln	2 Qf	nicht tastbar	nicht tastbar	45 000 30 %	9, 0 7, 2	216 000 18 %	seit 4 Monaten in klin. Beob- achtung; gute Besserung.
49 J.	Erstsympt. seit 2 Tagen.							

Ge. L.	stark red. A. Z. hämorrhag. Dia- these am Hals u. beiden Beinen.	3 Qf	3 Qf	nuchal, li. axillär u. inguinal kirschgroß	120 000 84, 5 %	11, 2 3, 2	zellreich 69 %	verstarb nach 4 Tagen, keine Besserung.
42 J.	Erstsymptome seit 4 Wochen.							

He. G.	Blässe, red. A. Z. multiple Petechien am ganzen Körper	3 Qf	nicht tastbar	kirschgroß in beiden Axillen u. Leistenbeu- gen.	160 000 96, 2 %	11, 2 4, 9	271 000 95, 7 %	verstarb nach zweieinhalb Mon., dazwischen gute Besserung
15 J.	Zahnfleischbluten Erstsymptome seit mehreren Monaten							

Tab. 1 a: Aufnahmebefunde und Dauer des Krankheitsverlaufs der untersuchten Patienten nach Klinikeinweisung.

Name	Allgemeinbefund	Leber	Milz	Lymphknoten	Leuko u. % Blasten	Hb. gr ^o %	Ery. Mill.	Thrombo	Zellzahl u. % Blasten im STP	Krankheitsdauer nach d. Aufnahme
Ka. P. 55 J.	starke Blässe, red. AZ u. EZ Petechien am Thorax u. Un- terschenkel bds. Erstsympt. seit Monaten	1 Qf	fragl. am Rip- penbo- gen	nicht tastbar	496 000 90 %	5	1,7	5 500	430 000 94 %	verstarb nach 9 1/2 Monaten dazwischen gute Besserung.
Kl. F. 48 J.	stark red. AZ u. EZ. Petechien der Mundschleim- haut. Erst- sympt. seit 6 Monaten.	3 Qf	3 Qf	re. axil. Pflaumen- groß; bds. mehrere Kl. Lk. axillär	115 000	13	4,3	88 000	1 020 000 42 %	Entlassung nach 2 Mon., gute Besserung; keine weitere Beobach- tung
Kr. B. 52 J.	Blässe, sehr red. AZ. Pura der Bel- ne. Erstsympt. seit 1 Mon.	nicht tastbar	1 - 2 Qf	nicht tastbar	90 000 92 %	6,4	2,3	45 000	127 000 95 %	seit 1 1/2 Mon. in Beobachtung; zeitweilige Besserung.
Kr. W. 30 J.	Blässe, mäßiger AZ Petechien beider Unterschen- kel u. am Abdo- men. Erstsympt. seit 10 Wochen	am Rip- penbo- gen	1 Qf	nicht tastbar	8 000 88 %	11,5	3,1	92 000	229 000 81 %	verstarb nach 19 Mon. dazwi- schen sehr gute Besserung.

Tab. 1 b: Aufnahmebefunde und Dauer des Krankheitsverlaufs der untersuchten Patienten nach Klinikweisung.

Name	Allgemeinbefund	Leber	Milz	Lymphknoten	Leuko u. % Blasten	Hb. Ery. gr. % Mill.	Thrombo % Blasten im STP	Zellzahl u. % Blasten im STP	Krankheitsdauer nach d. Aufnahme
Mü. R. 27 J.	Blässe, mäßiger AZ u. EZ keine Petechien, Erst- symptome seit 1 Mon.	1 1/2 Qf	1 Qf	nicht tastbar	3 725 57, 5 %	9, 7 2, 9	150 000	76 200 78 %	verstarb nach 3 Mon., dazwi- schen Besserung
Sch. K. 24 J.	guter AZ u. EZ. keine Petechien Erstsympt. seit 2 Monaten.	2 - 3 Qf	4 Qf	multiple lin- sengr. LK. am re. Sternoclei- domastoid.	160 000	11, 2 3, 4	114 000	400 000	verstarb nach 7 Mon., dazwi- schen Besserung.
Sch. L. 54 J.	Blässe, guter AZ, EZ, keine Petechien, sym- ptome seit 10 Monaten.	2 Qf	am Rippen bogen	nicht tastbar	59 000 24 %	5, 1 1, 5	72 000	113 500 26 %	verstarb nach 6 Mon., dazwischen leichte Besserung.
Wi. S. 14 J.	Blässe, mäßiger AZ, Petechien am Gaumen und Zunge, Erst- symptome seit 2 - 3 Monaten	3 Qf	2 Qf	multiple haselnuß- große am Hals und Axillen bds.	120 800 95, 6 %	4, 4 1, 4	36 000	260 000 92, 4 %	verstarb nach 4 Monaten, da- zwischen leich- te Besserung.

Tab. 1 c: Aufnahmebefunde und Dauer des Krankheitsverlaufs der untersuchten Patienten nach Klinikneinweisung.

METHODIK

a) Apparativer Aufbau

Caspersson (15) entwickelte 1936 eine Methode, um an Zellausstrichen quantitative photometrische Nukleinsäurebestimmungen durchzuführen. Die Zellkerne erscheinen im UV-Bereich bei $260\text{ m}\mu$ dunkel infolge der hohen Eigenabsorption der Nukleinsäuren bei dieser Wellenlänge. Durch eine fortlaufende Absorptionsmessung über allen Arealen der Zelle, gelingt es Konzentration und Gesamtgehalt an Nukleinsäuren in einer Größenordnung von 10^{-12} g zu erfassen.

Im Prinzip ist dabei folgender apparative Aufbau notwendig:

Lichtquelle, Monochromator und an Stelle der Cuvette für Absorptionsmessungen an Lösungen ein Mikroskop mit dem zu untersuchenden Zellausstrich, sowie ein Photomultiplier zur Messung des durchfallenden Lichtes. Für die Untersuchungen müssen im UV-Licht die gesamte Optik wie die Objektträger aus Quarzglas bestehen. Die Forderung, sämtliche zur Untersuchung kommenden Blut- und Knochenmarksausstriche auf Quarzobjektträgern auszustreichen, läßt sich für ein größeres Untersuchungsmaterial aus rein finanziellen Gründen nicht erfüllen. Deshalb wurde die Anfärbung der DNS mit Hilfe der Feulgenfärbung durchgeführt, die einen quantitativen Nachweis der DNS gestattet (19, 28 - 30). Das Maximum der Absorption der Feulgenfärbung liegt im sichtbaren Bereich zwischen 540 und $560\text{ m}\mu$.

Die photometrischen Messungen wurden mit dem automatisch registrierenden Cytophotometer UMSP I (Fa. K. Zeiss, Oberkochen) vorgenommen. Das Präparat wurde mäanderförmig abgerastert und das Integral der Extinktion über den einzelnen Zellarealen bestimmt. Dieser Wert ist der Feulgenanfärbung und damit dem DNS-Gehalt proportional. Alle Messungen erfolgten unter folgenden Bedingungen:

- 1) Apertur von Kondensor ($\text{NA} = 0,8$) und Objektiv ($\text{NA} = 1,25$)
- 2) Leuchtfeldblende: $2\text{ }\mu$ in Präparatebene
- 3) Multiplierblende: Durchmesser $1\text{ }\mu$ in Präparatebene
- 4) Monochromator: Wellenlänge $560\text{ m}\mu$, Spaltbreite $0,47 - 0,55\text{ mm}$
- 5) Registrierungsgeschwindigkeit: Das Präparat wurde mit dem Kreutztisch in einer Geschwindigkeit von $80\text{ }\mu/\text{min.}$ an dem zentralen Meßstrahl vorbeigeführt.
Schreiberdämpfung Stufe 1 ($0 - 100\%$ Absorption etwa 1 sec.)
- 6) Zeilenlänge bei der mäanderförmigen Absuchung: Die Wahl der Zeilenlänge hing von der Größe der Zelle ab (ungefähr $15 - 20\text{ m}\mu$).
- 7) Zeilenabstand: $1\text{ m}\mu$, bei sehr großen Zellen $2\text{ m}\mu$.

Der Kerndurchmesser jeder Zelle wurde mit einem Okularmikrometer bestimmt.

b) Färbetechnik

Die zu untersuchenden Blut- und Knochenmarkausstriche eines jeden Patienten wurden luftgetrocknet aufbewahrt. Zur Messung wurden die Präparate in synchronen Färbeschritten nach Feulgen (quantitative Anfärbung des DNS) gefärbt:

- 1) Fixation in 70 % Alkohol
- 2) 12 min. HCl-Hydrolyse bei 60° C
- 3) 1 Std. Schiff'sches Reagenz (0,5 g Pararosanilin in 15 ml HCl lösen, 0,5 g Kaliummetabisulfat in 85 ml Aqua dest. lösen und zusetzen. Nach 24 Std. Lösung filtrieren und im Dunkeln aufbewahren).
- 4) Dreimal je 10 min. spülen in folgender Spülflüssigkeit:
20 ml 1 n HCl, 1 g Kaliummetabisulfat, 360 ml H₂O.
- 5) Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe
- 6) Eindecken in Caedax (n = 1,55).

Alle Präparate eines Patienten wurden gemeinsam unter konstanten Bedingungen gefärbt. Bei jeder Färbung wurde ein Blutausrich der gleichen gesunden Versuchsperson mitgeführt und sofort nach der Färbung photometrisch gemessen. Wenn die Kontrollmessung nicht die gleichen Werte wie in der vorangegangenen Färbung ergab, wurde die ganze Färbeserie verworfen und die Färbung wiederholt.

c) Fehlerdiskussion

- 1) Fehler durch die Cytophotometrie:

Dieser Fehler wurde durch die oben angegebenen Meßbedingungen klein und für alle Untersuchungen konstant gehalten.

- 2) Unterschiedliche Anfärbung der DNS mit Schiff'schem Reagenz bei verschiedenen Färbeserien (s. Tab. 2):

Tab. 2 zeigt, daß DNS-Messungen an Präparaten zweier Färbeserien mit Schiff'schem Reagenz vom gleichen Ansatz innerhalb der Signifikanzgrenzen keine Unterschiede zeigen. Dagegen können Färbungen mit Schiff'schem Reagenz von verschiedenem Ansatz differieren. Der Fehler wurde dadurch klein gehalten, daß alle zu vergleichenden Präparate eines Patienten in einer Färbeserie gemeinsam gefärbt wurden. Für alle Untersuchungen konnte das gleiche Schiff'sche Reagenz verwendet werden.

- 3) Ungleichmäßige Anfärbung des Präparates an verschiedenen Arealen des Objektträgers:

Bei gleicher Färbetechnik und ausreichendem Abstand der Präparate in der Färbecuvette konnte kein Anhalt für eine unterschiedliche Anfärbbarkeit an verschiedenen Bezirken desselben Präparates gewonnen werden. Trotzdem verstellten wir bei allen Messungen das Präparat mehrfach, so daß jede Meßserie einen repräsentativen Querschnitt ergab. Die Mittelwerte der DNS-Messungen an Paraleukoblasten aus verschiedenen Arealen eines Präparates zeigt Tab. 3.

- 4) Ausbleichen des Farbstoffes:

Mit allen Eindeckungsmedien kommt es im Laufe von Monaten zu einem Aus-

	Neues Schiff'sches Reagenz	Altes Schiff'sches Reagenz	gemessene Zellzahl
Färbung I	$30,3 \pm 0,90$		10
Färbung II	$30,4 \pm 0,92$		10
Färbung III		$24,4 \pm 3,45$	10

Tab. 2: Rel. DNS-Gehalt in AE. und Vertrauensgrenzen (für $p = 0,01$)
von segmentkernigen Leukozyten einer gesunden Versuchsperson.
Messungen an Präparaten aus verschiedenen Färbeserien.

Name	I. Areal	II. Areal	III. Areal
Kr. B.	$35,2 \pm 0,97$	$35,3 \pm 1,2$	$35,3 \pm 0,65$
gemessene Zellzahl	17	17	16

Tab. 3: Rel. DNS-Gehalt in AE. und Vertrauensgrenzen (für $p = 0,01$)
in Paraleukoblasten des Pat. Kr. B. (Präp. Nr. 449, Feulgen-Nr. A 31/444). Messungen in verschiedenen Arealen eines Präparates.

bleichen der Feulgenfärbung. Durch folgende Maßnahmen wurde versucht, diese Fehlerquelle möglichst klein zu halten:

- a) Aufbewahrung der Präparate im Dunkeln
- b) Rasche Aufarbeitung einer Färbeserie (innerhalb eines Monats).

d) Auswertung

Von jedem Präparat wurde feulgenphotometrisch an 100 (50) Paraleukoblasten der relative DNS-Gehalt in Arbeitseinheiten (AE) bestimmt. Dabei fanden sich wenige Zellen, die einen gegenüber der Mehrzahl eindeutig zu unterscheidenden und stark erhöhten DNS-Gehalt zeigten. Wie noch auszuführen sein wird, handelt es sich dabei um solche Zellen, die sich in der prämitotischen DNS-Verdopplungsphase befinden. Aus jeder an 1 Präparat gewonnenen Meßreihe wurde der Prozentsatz dieser in DNS-Synthese stehender Zellen bestimmt.

Von den andern Zellen, die untereinander einen sehr einheitlichen relativen DNS-Gehalt aufwiesen, wurde der Mittelwert $\bar{x}$ berechnet

$$(\bar{x} = \frac{\sum x}{n}).$$

Dieser Wert lag bei der von uns angewandten Technik zwischen 33 bis 35 relativen DNS-Arbeitseinheiten. Außerdem wurde der einfache mittlere Fehler s

$$(s = \pm \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}),$$

der mittlere Fehler des Mittelwertes

$$\delta_M (\delta_M = \frac{s}{\sqrt{n}})$$

und daraus die Vertrauensgrenzen bestimmt (31). Die Mittelwerte zweier Gruppen von Versuchsergebnissen unter der Therapie wurden mit Hilfe des t-Tests bzw. des Welsh-Tests verglichen. Bei der Größenbestimmung der Paraleukoblasten wurde genauso vorgegangen.

ERGEBNISSE

Bei einem Teil unserer Patienten untersuchten wir nur Paraleukoblasten aus dem Sternalpunktat (STP) oder aus dem peripheren Blut, bei 3 Kranken sowohl Zellen aus dem STP als auch aus dem peripheren Blut. Der relative DNS-Gehalt der Paraleukoblasten nach Feulgenfärbung aus dem STP und der Peripherie war bei ein und demselben Patienten nicht immer gleich (s. Tab. 12).

Befunde bei den einzelnen Patienten:

1) Die Patientin Fi. kam schon eine Woche nach den 1. Symptomen in schlechtem Allgemeinzustand zur Klinikaufnahme. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Patientin von uns erstmals untersucht. Es wurde bei ihr die Diagnose eines Myeloblastenschubs bei chronisch myeloischer Leukämie gestellt. Eine Vorbehandlung war bis dahin nicht erfolgt. Wie aus der Abb. 1 zu entnehmen ist, fanden sich bei der 1. Untersuchung 45 000 Leukozyten, davon 37 % Myeloblasten, im peripheren Blut. Der mittlere DNS-Gehalt, der nicht in DNS-Verdopplung befindlichen Paraleukoblasten, betrug 36,1 AE (Abb. 1, Tab. 6); er lag über dem Wert normaler Segmentkerniger. Im Anschluß an diese Untersuchung erhielt die Patientin 20 mg Methotrexat intravenös injiziert.

Schon bei der 1. Kontrolle, 6 Stunden nach der Injektion, fanden sich deutliche Veränderungen gegenüber der Erstuntersuchung. Die absolute Feulgenanfärbung sank auf 33,6 AE ab, aber auch die Streubreite der Meßwerte der einzelnen Paraleukoblasten untereinander war größer (s. Tab. 6, Abb. 1).

9 Stunden später lag der DNS-Gehalt wieder über dem Ausgangswert; bei den Kontrollmessungen nach 24 Stunden ergab die DNS-Bestimmung einen Abfall; am 2. Tag war keine Änderung mehr eingetreten. Gleichzeitig war die Zellgröße der Paraleukoblasten vorübergehend gesunken.

Diese Befunde bezogen sich auf ruhende Zellen. Gleichzeitig fanden sich je-

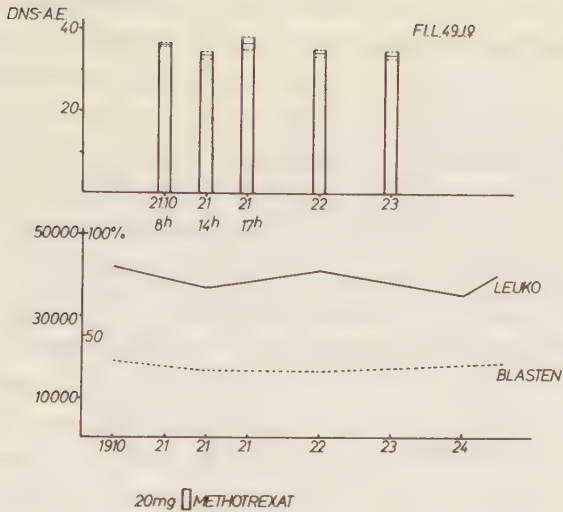


Abb. 1: Patientin Fi. L., 49 J.

doch auch Zellen mit einem wesentlich höheren DNS-Gehalt, die sich in der Phase der DNS-Verdopplung befanden (s. Methodik), in der der DNS-Gehalt vor dem Eintritt in eine neue Mitose das doppelte des Ausgangswerts erreicht. Der Anteil dieser Zellen betrug bei der Erstuntersuchung 6 %, 2 Tage nach Behandlungsbeginn lag er bei 2,5 % (Tab. 9). Bei der von uns untersuchten Zellzahl kommt diesem Abfall keine Bedeutung zu. Ein ähnlicher Befund wurde jedoch auch bei den andern Kranken nach Methotrexatbehandlung erhoben (s. Tab. 9).

Während somit bei der Patientin deutliche Veränderungen am Kernchromatin nachweisbar wurden, blieb die Leukozytenzahl und die Zahl der Paraleukoblasten über den Zeitraum der Untersuchungen sowie in den nachfolgenden 8 Tagen unverändert. Es kam zu keinerlei Besserung des Allgemeinzustandes. In der Folgezeit änderte sich bei der Kranken auch unter Decortin (200 mg/d) der hämatologische und klinische Befund nicht. Erst unter 6 mg Myleran pro die kam es zum Leukozytenabfall und zur Abnahme der leukämischen Zellen. Die Patientin wurde nach 4 monatigem Klinikaufenthalt mit einer Myleran-dauermedikation (2 mg/d) nach Hause entlassen.

2) Frau Kr. B. kam 4 Wochen nach den Erstsymptomen ebenfalls noch unbehandelt zur stationären Aufnahme. Wie aus Abb. 2 hervorgeht, fand sich bei der Erstuntersuchung im peripheren Blut eine Leukozytose von 90 000, davon 92 % Paraleukoblasten. Die Bestimmung des relativen DNS-Gehaltes der ruhenden Paraleukoblasten vor Therapiebeginn ergab 37,6 AE; er lag damit deutlich über dem Mittelwert segmentkerniger Granulozyten (Tab. 2). Die Patientin erhielt im Anschluß an die Messungen 20 mg Methotrexat i.v. Wie bei der Patientin Fi. fanden wir nach 24 Stunden einen Abfall des relativen DNS-Gehaltes, der am 4. Tag wieder erhöht lag. Am 5. Tag nach der Injektion war er aber sehr stark erniedrigt (Abb. 2, Tab. 6, Tab. 9).

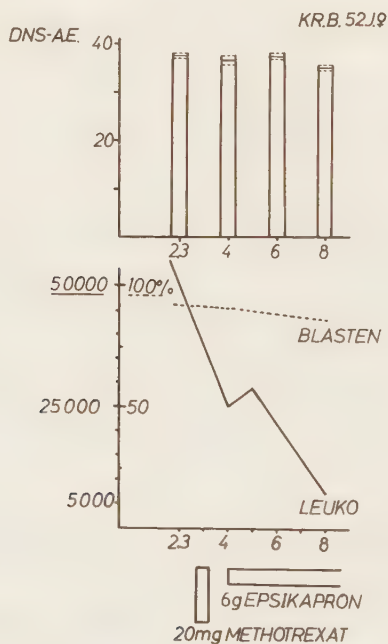


Abb. 2: Patientin Kr. B., 52 J.

Im gleichen Zeitraum kam es zu einem deutlichen Abfall der Leukozyten, sowie zu einer deutlichen subjektiven Besserung bei der Patientin. Die Kranke zeigte ein gutes Ansprechen auf Methotrexat. Sie erhielt 14 Tage und 3 Wochen

nach der 1. Injektion nochmals je 20 mg Methotrexat parenteral verabreicht. 6 Wochen nach der Klinikeinweisung konnte die Patientin gebessert und in relativ gutem AZ entlassen werden.

3) Der Patient Kl. F. wurde schon in einem auswärtigem Krankenhaus mit 20 mg/d Methylprednisolon vorbehandelt. 4 Wochen später wurde er hierher in die Klinik verlegt; und mit 80 mg/d Methylprednisolon sowie mit 2 Methotrexatstößen à 20 mg i.v. weiterbehandelt. Der Patient reagierte klinisch aber weder auf die Steroidbehandlung noch auf die Antimetabolittherapie.

Wir führten unsere feulgenphotometrischen DNS-Bestimmungen nach diesen Vorbehandlungen durch. Als Ausgangswert fanden wir einen DNS-Gehalt in den ruhenden Paraleukoblasten von 36,9 AE (Abb. 3). Nach dieser Bestimmung erhielt der Kranke nochmals Methotrexat, nun aber in einer Dosierung von 50 mg, i.v. injiziert. Innerhalb von 5 Tagen sank die Leukozytenzahl von 57 000 auf 15 800 ab, davon waren allerdings noch 54 % Paraleukoblasten. Trotz der erhöhten Methotrexatdosis fanden wir im Gegensatz zu den beiden

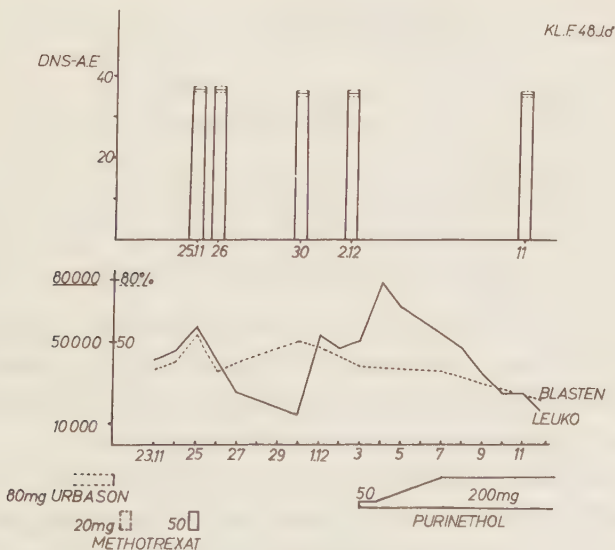


Abb. 3: Patient Kl. F., 48 J.

zuvor untersuchten Patienten keine Veränderung im feulgenphotometrisch bestimmten DNS-Gehalt der Paraleukoblasten am 1. und 5. Tag nach der Injektion; auch ließ sich keine Änderung in der Zellgröße feststellen (Tab. 6, s.a. Tab. 9). 8 Tage später war jedoch die Leukozytenzahl mit 80 000 höher als zuvor. Da der Patient nicht mehr auf Methotrexat ansprach, wurde die Behandlung mit Puri-Nethol fortgesetzt (von 50 mg auf 200 mg in 4 Tagen ansteigend). Vor der 1. Puri-Netholgabe wurde der DNS-Gehalt in den Paraleukoblasten erneut bestimmt. Er lag in den ruhenden Zellen bei 36,3 AE (Abb. 3). Unter Puri-Nethol kam es zum Abfall der Leukozyten; am 9. Tag waren es 28 000, davon 30 % Paraleukoblasten. Während es klinisch zu einer deutlichen Besserung kam, zeigte die Messung des DNS-Gehalts in den Paraleukoblasten keinerlei Veränderung. Der Patient sprach weiterhin gut auf die Antimetabolitenbehandlung an, so daß das Puri-Nethol stufenweise auf 50 mg/d reduziert werden konnte. Bei subjektivem Wohlbefinden konnte Kl. nach 2 monatigem Krankenhausaufenthalt mit 15 000 Leukozyten, 40 % Paraleukoblasten nach Hause entlassen werden.

4) Bei dem Patienten Br. traten die ersten Symptome 6 Wochen vor der Klinikeinweisung auf; außerhalb wurde die Diagnose "akute Leukämie" gestellt und der Kranke wurde mit 50 mg/d Hostacortin-H vorbehandelt; trotz dieser Therapie verschlechterte sich der Zustand des Patienten zusehends, so daß er in sehr schlechtem Allgemeinzustand aufgenommen wurde. Bei der Aufnahmeuntersuchung fanden sich im peripheren Blut 128 000 Leukozyten, davon 88 % Paraleukoblasten. Der mittlere DNS-Gehalt der ruhenden Paraleukoblasten wurde bei dem vorbehandelten Kranken mit 34,9 AE bestimmt (Abb. 4, Tab. 4). Nach dieser Untersuchung wurde bei dem Patienten sofort die Hostacortindosis auf 300 mg/d erhöht. Die 1. Kontrolle des DNS-Gehaltes in den ruhenden Paraleukoblasten an einem Ausstrich des peripheren Blutes nach 24 Stunden zeigte keine Veränderung gegenüber dem Vorwert. Auch klinisch verschlechterte sich der Zustand des Patienten trotz der hohen Steroidmenge sehr schnell; der Kranke sprach auf die Behandlung nicht an und die Leukozyten stiegen auf 189 000, davon 93 % Paraleukoblasten. Die feulgenphotometrische Kontrolle des relativen DNS-Gehaltes am 5. Behandlungstag

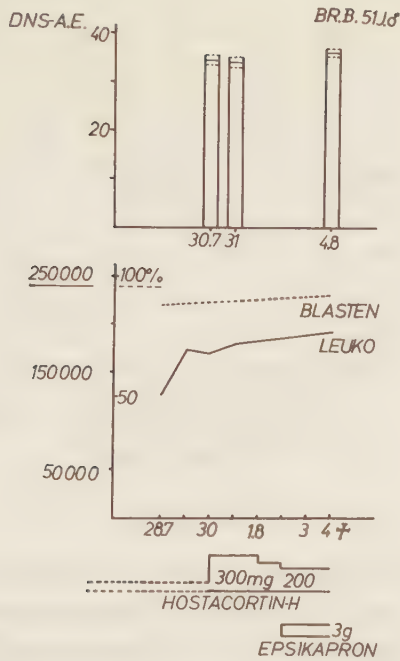


Abb. 4: Patient Br. B., 51 J.

zeigte gegenüber der letzten Messung eine deutliche Erhöhung des DNS-Wertes in den Paraleukoblasten (Abb. 4, Tab. 4; s. a. Tab. 7). Der Patient verstarb 7 Tage nach der Klinikaufnahme am Herz-Kreislaufversagen.

5) Die Kranke Ge. bemerkte die ersten Krankheitszeichen 4 Wochen vor der Klinikeinweisung. Außerhalb war die Patientin mit 40 mg/d Steroiden vorbehandelt worden. Bei der ersten Untersuchung in der Klinik befand sich die Patientin in einem stark herabgesetzten Allgemeinzustand; es fand sich eine Leukozytose von 170 000 im peripheren Blut, davon 84,5 % Paraleukoblasten. Die Bestimmung des relativen DNS-Gehaltes der ruhenden Paraleukoblasten ergab 32,1 AE (Abb. 5, Tab. 4). Wie auch bei Br. wurde bei dieser Patientin sofort eine hochdosierte Steroidbehandlung mit 200 mg/d eingeleitet und

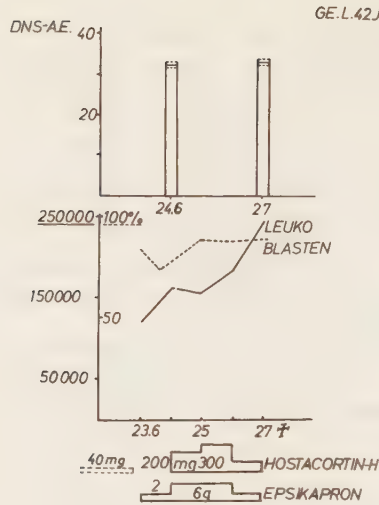


Abb. 5: Patientin Ge. L., 42 J.

am nächsten Tag die Dosis auf 300 mg/d erhöht. Die Kranke zeigte aber keinerlei Ansprechen auf die Therapie; die Leukozyten stiegen ständig an (Werte bis 243 000), der Anteil der Paraleukoblasten betrug 89 %. Die Untersuchung des DNS-Gehaltes am 3. Tag nach Einsetzen der Therapie zeigte, daß der DNS-Wert im Vergleich zur ersten Messung keine Änderung aufwies (Abb. 5, Tab. 4, s.a. Tab. 7). Es kam zu einer zunehmenden Größenpolymorphie der Paraleukoblasten sowie zu einer Zunahme der mittleren Zellgröße. Der Zustand der Patientin verschlechterte sich weiterhin sehr schnell, so daß die Kranke 4 Tage nach der Einlieferung in der Klinik verstarb.

6) Bei dem Kranken Sch. K.H. handelte es sich um eine chronisch myeloische Leukämie. Es war hier in der Klinik mit Myleran (1 mg/d) und Steroiden (20 mg/d) behandelt worden. Er konnte nach 3 Monaten gut gebessert entlassen werden (1 800 Leuko, keine unreifen Zellen).

1 Monat später mußte der Patient in schlechtem Zustand wieder aufgenommen werden. Im peripheren Blut betrug die Leukozytenzahl 4 000, davon 3 % Myeloblasten. Zu Hause war der Kranke mit 20 mg Steroiden pro die weiterbehandelt.

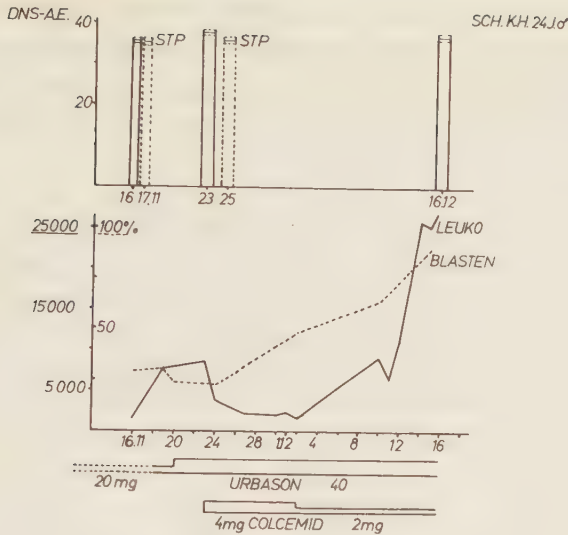


Abb. 6: Patient Sch. K.H., 24 J.

delt worden; diese Dosis wurde in der Klinik über 14 Tage weiter verabreicht. Wir führten während dieser Behandlung zum ersten Mal unsere feulgenphotometrischen DNS-Bestimmungen sowohl an einem Ausstrich des peripheren Blutes als auch an einem Präparat einer Sternalpunktion durch. Dabei lag der mittlere relative DNS-Gehalt der ruhenden Paraleukoblasten in der Peripherie bei 35,7 AE; bei den Zellen im Sternalmark betrug er 35,1 AE (s. Abb. 6, Tab. 4). Wegen weiterer Verschlechterung (23 % Myeloblasten) wurde die Steroidmenge auf 40 mg/d verdoppelt und 3 Tage später noch 4 mg Colcemid zusätzlich gegeben. Trotz Leukozytenabfall blieb der Anteil der Paraleukoblasten unverändert. Die Messung der DNS in den Paraleukoblasten an einem Ausstrich des peripheren Blutes am 3. Tag nach Erhöhung der Steroiddosis wies einen deutlich erhöhten Wert mit 37,7 AE gegenüber dem Vorwert von 35,7 AE auf (Tab. 4). Die Kontrolle an einem Sternalmarkpräparat, weitere 2 Tage später, zeigte mit einem DNS-Gehalt von 35,8 keine Veränderung im Vergleich zur 1. Messung im Sternalmark (Tab. 4 und 7). In der Folge kam es zu einem weiteren Leukozytenanstieg bis auf 32 000 und einer Zunahme der Myeloblasten auf 85 %. Wir führten nochmals eine feulgenphotometrische Be-

stimmung des DNS-Gehaltes an Paraleukoblasten des peripheren Blutes zu diesem Zeitpunkt durch, die einen unveränderten Befund ergab. Nach 6wöchiger stationärer Behandlung wurde der Patient gegen ärztlichen Rat in schlechtem Allgemeinzustand aus der Klinik geholt; 1 Monat später verstarb der Kranke zu Hause.

7) Erst 3 Tage vor der Aufnahme hier in der Klinik bemerkte der Patient He. G. die ersten deutlichen Krankheitszeichen. Bei der Untersuchung fand sich der Kranke, der bis dahin unbehandelt war, in einem reduzierten Allgemeinzustand. Wie Abb. 7 zeigt betrug im peripheren Blut die Leukozytenzahl 160 000, davon 96,2 % Paraleukoblasten. Die Bestimmung des DNS-Gehaltes

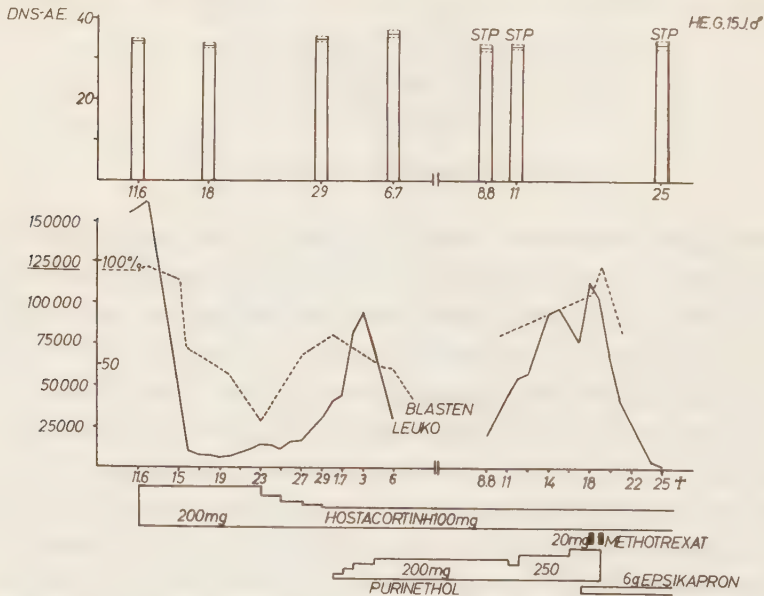


Abb. 7: Patient He. G., 15 J.

ergab 34,2 AE (Abb. 7, Tab. 4); im Anschluß an diese Untersuchung wurde bei He. eine hochdosierte Steroidbehandlung mit 200 mg Hostacortin-H pro die begonnen. Dabei kam es zu einem Sturz der Leukozyten auf Werte unter 10 000, der Paraleukoblastenanteil fiel unter 20 % ab. Eine feulgenphotometrische Kontrolle, 7 Tage nach Einsetzen der Behandlung, ergab einen

deutlich erniedrigten mittleren DNS-Gehalt in den Paraleukoblasten gegenüber der Messung vor Therapiebeginn (Abb. 7, Tab. 4). Nach 14 Tagen wurde die Steroidmenge stufenweise auf 100 mg/d reduziert. Unter der verringerten Steroiddosis begannen die Leukozyten wieder anzusteigen (Abb. 7). Die Messung des mittleren DNS-Gehaltes zu diesem Zeitpunkt ergab einen Wert von 34,8 AE; er war im Vergleich zur letzten Kontrolle stark angestiegen und lag sogar noch höher als der Ausgangswert (Tab. 4, Tab. 7).

Da die alleinige Steroidbehandlung nicht mehr therapeutisch wirksam war, wurde zusätzlich zu den 100 mg Steroiden Puri-Nethol (in 5 Tagen von 50 auf 200 mg/d ansteigend) gegeben. Unter der Antimetabolittherapie kam es erneut zum Abfall der Leukozyten und Paraleukoblasten (Abb. 7). Am 7. Behandlungstag fand sich gegenüber der Messung vor der Therapie jetzt ein stark erhöhter DNS-Gehalt in den Paraleukoblasten (Tab. 5; s.a. Tab. 8). Unter dieser Dauermedikation von 100 mg Hostacortin-H pro die und 200 mg/d Puri-Nethol hielt die klinische und hämatologische Besserung fast 1 Monat an. Nach dieser Zeit setzte ein neuer Schub mit einem Leukozytenanstieg auf über 100 000 Zellen ein. Die feulgenphotometrische Untersuchung der DNS ergab am STP einen Wert von 33,1 AE (Abb. 7, Tab. 6). Die Puri-Netholdosis wurde nun auf 250 mg/d und 5 Tage später auf 300 mg/d erhöht. Der Kranke sprach jedoch auf diese Behandlung nicht mehr an, deshalb wurde Puri-Nethol abgesetzt und nur die Steroidtherapie (100 mg/d Hostacortin-H) beibehalten. Er erhielt dafür an zwei aufeinander folgenden Tagen je 20 mg Methotrexat i.v. injiziert. Auf diese Behandlung kam es nochmals zum Leukozytensturz auf Werte unter 5 000, der Anteil der Paraleukoblasten betrug aber immernoch 65 %. Eine Kontrollmessung des DNS-Gehaltes in den Paraleukoblasten an einem Sternalmarkpräparat 6 Tage nach der letzten Methotrexatinjektion zeigte gegenüber den vorhergehenden Messungen keine Veränderung (Abb. 7, Tab. 6 und Tab. 9). Trotz einer Senkung der Leukozytenzahl konnte der Krankheitsablauf durch die Methotrexatgabe nicht mehr beeinflußt werden, und der Patient starb 6 Tage später.

8) Die Patientin Ka. war schon hier in der Klinik 4 1/2 Monate mit Steroiden (300 mg/d) behandelt worden. Sie sprach gut auf die Therapie an und konnte

mit 10 mg Hostacortin-H als Dauermedikation nach Hause entlassen werden.

3 Monate später mußte die Kranke in schlechtem Allgemeinzustand wieder in der Klinik aufgenommen werden. Im peripheren Blut fand sich eine Leukozytose von 115 000, davon 92 % Paraleukoblasten (Abb. 8). 1 Tag nach der Wiederaufnahme führten wir die feulgenphotometrische Untersuchung des DNS-Gehaltes

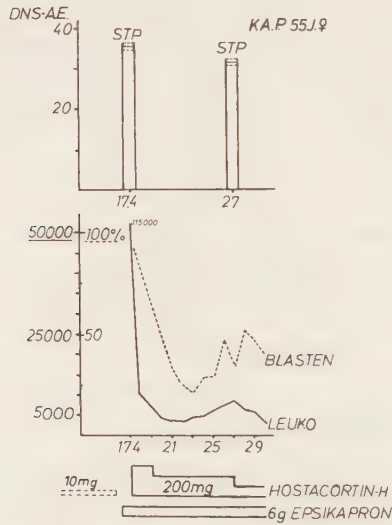


Abb. 8: Patientin Ka. P., 55 J.

an ruhenden Paraleukoblasten an einem Ausstrich des Sternalmarks durch. Der DNS-Gehalt in diesen Zellen lag bei 35,8 AE. Nach dieser Bestimmung erhielt die Patientin Hostacortin-H in einer Dosierung von 300 mg/d. Unter den Nebennierenrindensteroiden kam es zum Leukozytensturz (3 700 Leuko, 33 % Paraleukoblasten) und der Allgemeinzustand besserte sich deutlich. 10 Tage nach Behandlungsbeginn kontrollierten wir den relativen DNS-Gehalt der Paraleukoblasten im Sternalmark. Wir fanden, daß er im Vergleich zur letzten Bestimmung stark abgefallen war (Abb. 8, Tab. 4 und 7). Die Zellgröße hatte, bei ziemlich großer Streubreite, zugenommen (Tab. 4). 1 Monat später kam es zur erneuten Zunahme der leukämischen Zellen. Trotz

zusätzlicher Puri-Netholgabe (100 mg/d) verschlechterte sich der Zustand weiter. Die Patientin verstarb 9 Wochen nach der 2. Klinikaufnahme.

9) 1 1/2 Jahre befand sich der Patient Kr. W. mit einer Dauermedikation von 100 mg/d Puri-Nethol und 12,5 mg/d Hostacortin-H in Vollremission. Bei der Wiederaufnahme wegen eines Ikterus betrug die Leukozytenzahl im peripheren Blut 1 550, 6 % Paraleukoblasten. Die Bestimmung des DNS-Gehaltes an Paraleukoblasten des Sternalmarks ergab einen relativ hohen Wert von 37,8 AE (Abb. 9, Tab. 4). Da die pathol. Zellen anzusteigen begannen, wurde die Steroiddosis von 12,5 über 20 auf 100 mg/d erhöht. Auch das Puri-Nethol, das

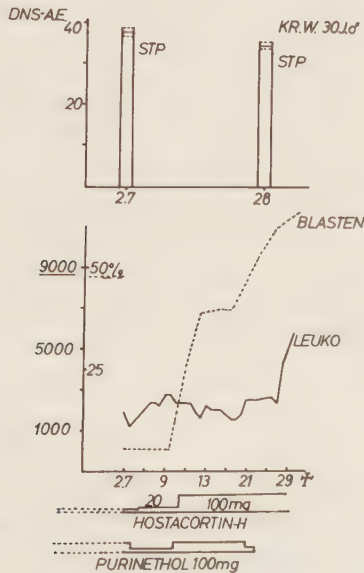


Abb. 9: Patient Kr. W., 30 J.

auf 50 mg/d reduziert worden war, wurde wieder auf die doppelte Menge erhöht. Der Kranke sprach auf die Behandlung nicht an, die Paraleukoblasten stiegen bis über 60 %, die Leukozyten lagen bei Werten um 2 000. Eine Kontrolluntersuchung am Sternalmarkausstrich, der 26 Tage nach der 1. Untersuchung gewonnen wurde, zeigte, daß der DNS-Gehalt der Paraleukoblasten

gegenüber der letzten Messung stark abgesunken war (Abb. 9, Tab. 4, Tab. 7). Eine Änderung in der Zellgröße und Morphologie ließ sich jedoch nicht beobachten.

Nach rapider Verschlechterung verstarb der Patient 7 Tage nach der letzten DNS-Bestimmung.

10) Die Patientin Sch. L. wurde in einem auswärtigen Krankenhaus mit 20 mg Steroiden pro die vorbehandelt. Bei der Aufnahmeuntersuchung hier in der Klinik befand sich Frau Sch. in gutem Allgemeinzustand. Im peripheren Blut betrug die Leukozytenzahl 5900, davon 30 % Paraleukoblasten. Zunächst wurde die Patientin mit 20 mg Steroiden weiterbehandelt. Der hämatologische Befund verschlechterte sich jedoch. Bei der 1. feulgenphotometrischen Untersuchung des DNS-Gehaltes an Paraleukoblasten fand sich ein DNS-Wert von 37,3 AE; erlag damit deutlich über dem Wert von normalen Segmentkernigen. Diese Bestimmung wurde vor einer Erhöhung der Steroiddosis auf 200 mg/d durchgeführt; danach kam es zu einem Abfall der unreifen Zellen im peripheren Blut auf 13 %. Die weiteren Untersuchungen erfolgten 2, 4 und 16 Tage nach Beginn der hochdosierten Steroidtherapie. Dabei stieg der DNS-Gehalt der Paraleukoblasten zunächst an (Abb. 10, Tab. 4) um am 16. Tag wieder abzufallen. Während diesen Untersuchungen ließ sich in der Zellmorphologie und

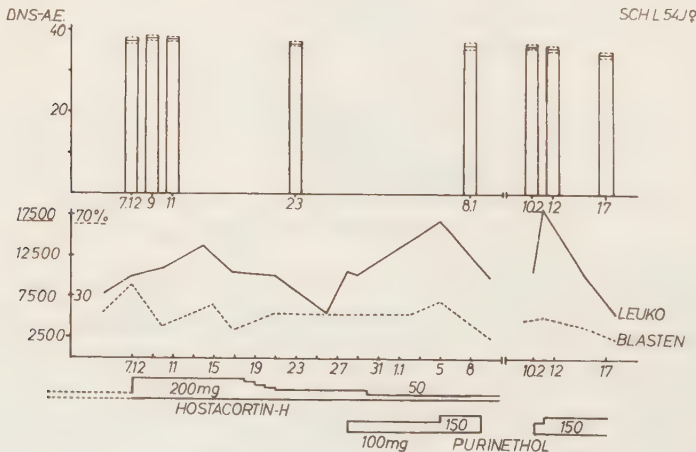


Abb. 10: Patientin Sch. L., 54 J.

in der Größe der Zellen keine Veränderung nachweisen (s. a. Tab. 7).

Da unter der Hostacortinbehandlung ein Steroiddiabetes auftrat, mußte die Dosis auf 50 mg/d reduziert werden. Dazu wurde eine Behandlung mit Puri-Nethol begonnen und die Steroide schließlich ganz abgesetzt. Der DNS-Gehalt in den Paraleukoblasten zeigte vor und 11 Tage nach Beginn der Antimetabolittherapie keine Änderung (Abb. 10, Tab. 5).

4 Wochen fühlte sich die Patientin subjektiv wohl. In dieser Zeit konnte das Puri-Nethol zeitweilig ganz abgesetzt werden; danach kam es zur erneuten Verschlechterung und es wurde Puri-Nethol (150 mg/d) gegeben. Feulgenphotometrische DNS-Untersuchungen ergaben, daß der DNS-Gehalt gegenüber den vorhergehenden Untersuchungen unter Puri-Nethol gleichgeblieben war. Auch 2 Tage später ließ sich noch keine Veränderung feststellen; am 7. Tag nach der erneuten Puri-Netholgabe war der mittlere DNS-Gehalt in den Paraleukoblasten deutlich niedriger (Abb. 10, Tab. 5, s. a. Tab. 8). Während es sowohl nach der 1. als auch nach der 2. Puri-Nethol-Behandlung in gleicher Weise klinisch zu einer deutlichen Besserung kam, waren die photometrischen Befunde verschieden. Unter der 1. Puri-Netholbehandlung, die jedoch gleichzeitig mit Steroiden kombiniert war, blieb der DNS-Gehalt in den Paraleukoblasten völlig unbeeinflusst, während der 2. Behandlung kam es zu einem Abfall.

4 Wochen später kam es zu einer nochmaligen Verschlechterung, die durch Puri-Nethol nicht mehr zu beeinflussen war und die Patientin verstarb nach 7monatiger Klinikbehandlung.

11) 4 Wochen vor der Aufnahme hier in der Medizinischen Klinik bemerkte der Kranke Wi. die 1. deutlichen Krankheitszeichen. Bei der Aufnahmeuntersuchung fand sich der Patient in einem mäßig guten Allgemeinzustand. Im peripheren Blut betrug die Leukozytenzahl 128 000, davon 95,6 % Paraleukoblasten (Abb. 11). Die photometrischen Untersuchungen bei dem unvorbehandelten Kranken ergaben einen gegenüber dem Durchschnitt der anderen Kranken erhöhten DNS-Gehalt in den ruhenden Paraleukoblasten. Danach wurde bei dem Patienten eine Behandlung mit Nebennierenrindensteroiden (200 mg/d) begonnen. Subjektiv fühlte er sich unter dieser Medikation besser; die Leukozytenzahl sank gering ab, der Anteil der Paraleukoblasten blieb aber 90 %. Die Untersuchung am

3. Tag nach Behandlungsbeginn zeigte einen Abfall des DNS-Gehaltes in den Paraleukoblasten (Abb. 11, Tab. 4 und 7). Da es unter der Steroidbehandlung zu

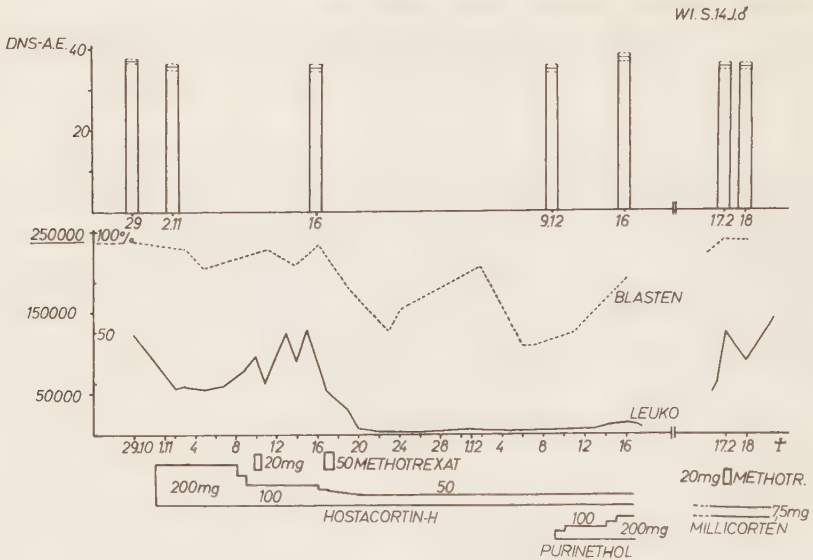


Abb. 11: Patient Wi. S., 14 J.

keiner wesentlichen hämatologischen Besserung kam, erhielt der Patient nach Reduzierung der Steroiddosis 20 mg Methotrexat i.v. injiziert. Auch danach trat keine Befundänderung ein und der 6 Tage später in den ruhenden Paraleukoblasten bestimmte DNS-Gehalt war unverändert (Abb. 11, Tab. 6). Nach einer nochmaligen Injektion von Methotrexat, jetzt in einer Dosierung von 50 mg, kam es jedoch zum Leukozytensturz bis auf Werte um 2 000 und die Paraleukoblasten sanken bis auf 50 % ab (Abb. 11). Leider konnte zu diesem Zeitpunkt an dem zellarmen Feulgenpräparat keine verwertbare Untersuchung durchgeführt werden.

3 Wochen später wurde eine Behandlung mit Puri-Nethol (200 mg), zusätzlich zu den 50 mg Steroiden, begonnen. Der Kranke fühlte sich dabei subjektiv wohl, ohne daß es zu einer wesentlichen hämatologischen Beeinflussung kam. Der feulgenphotometrisch bestimmte DNS-Gehalt in den Paraleukoblasten war vor dem Behandlungsbeginn mit Puri-Nethol gegenüber der letzten Kontrolle unver-

ändert, stieg aber während der 7tägigen Puri-Netholgabe deutlich an (Abb. 11, Tab. 5 und 8).

Über 1 Monat lang war der Allgemeinzustand unter Millicorten, in einer Dosierung von 7,5 mg/d ausreichend. Dann kam es plötzlich wieder zum Ansteigen der Leukozyten auf 24 000, davon 90 % Paraleukoblasten. Trotz zusätzlicher Injektion von 20 mg Methotrexat stiegen die Leukozyten weiter auf 133 400 an. Die photometrischen DNS-Untersuchungen an Paraleukoblasten im peripheren Blut vor und 1 Tag nach der Injektion, ergaben keinerlei Veränderungen des DNS-Wertes (Abb. 11, Tab. 6 und 9).

Es bildete sich eine schwere Gesichtspfleumone aus und der Patient verstarb 7 Tage nach der letzten Untersuchung des DNS-Gehaltes.

12) Mü. R. bemerkte die ersten Symptome 4 Wochen vor der Aufnahme in einem auswärtigen Krankenhaus. Dort wurde der Patient zunächst 2 Monate mit 40 mg/d Steroiden behandelt; 10 Tage vor der Verlegung in die Klinik hierher wurde die Dosis auf 20 mg/d verringert. Bei der Aufnahmeuntersuchung fand sich der Patient in einem mäßig guten Allgemeinzustand. Im peripheren Blut betrug die Leukozytenzahl 3 725, davon 30 % Paraleukoblasten. Die DNS-Bestimmung in den Paraleukoblasten an einem Ausstrichpräparat des Sternalmarks ergab einen Wert von 33,1 AE (Abb. 12, Tab. 5). Unter Beibehaltung der Steroidmedikation in einer Dosierung von 20 mg/d kam es zu einer allmählichen Verschlechterung. Daraufhin wurde zusätzlich Puri-Nethol (150 mg/d) gegeben; vorübergehend sank die Leukozytenzahl und der prozentuale Anteil der Paraleukoblasten wieder ab. Das Allgemeinbefinden des Patienten besserte sich. 18 Tage nach Beginn der Puri-Netholbehandlung ergab die Kontrolle des DNS-Gehaltes in Paraleukoblasten des Sternalmarks einen niedrigeren Wert als die Messung vor Einsetzen der Therapie (Abb. 12, Tab. 5). Wenig später verschlechterte sich der Zustand des Patienten trotz Erhöhung der Puri-Nethol-Dosis auf 200 mg/d. 5 Wochen später verstarb der Patient nach insgesamt 3monatiger Klinikbehandlung.

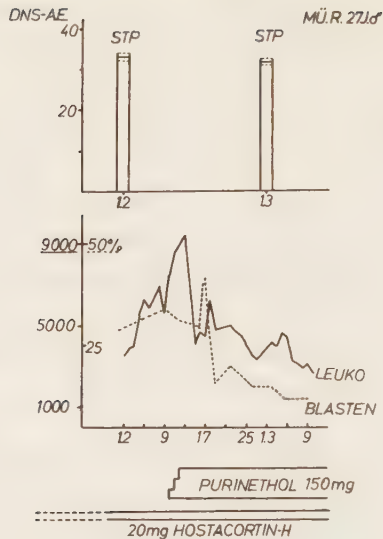


Abb. 12: Patient Mü. R., 27 J.

Zusammenfassung der Ergebnisse

Bei 12 Patienten führten wir feulgenphotometrische Untersuchungen des DNS-Gehaltes in ruhenden Paraleukoblasten vor und nach der Behandlung mit Steroiden (8mal), Puri-Nethol (6mal) und Methotrexat (6mal) durch. Dabei wurde in einem Teil der Fälle die antileukämische Behandlung nur mit einem Medikament (7mal) durchgeführt. In den übrigen Fällen wurde derselbe Patient gleichzeitig mit mehreren Medikamenten (s. Abb. 1 - 12) behandelt. Es wurde jedoch darauf geachtet, daß mindestens 8 bis 10 Tage vor der Untersuchung eines neuen Medikamentes keine Änderungen in dem bisherigen Behandlungsschema vorgenommen wurden. Die Erstbefunde der Feulgenanfärbbarkeit in den Paraleukoblasten zeigt vergleichend Tab. 13. Gleichzeitig bestimmten wir den prozentualen Anteil der Paraleukoblasten, der sich auf Grund eines erhöhten DNS-Gehaltes in der DNS-Synthesephase befand (Tab. 7 - 9).

1) Steroidbehandlung:

Nach der Steroidbehandlung untersuchten wir den DNS-Gehalt in den Paraleukoblasten bei 8 Kranken. Bei dem Patienten Kr. W. wurde zusätzlich zu den Nebennierenrindenhormonen noch Puri-Nethol (100 mg/d) verabreicht.

Klinisch und hämatologisch besserte sich der Zustand bei 3 Kranken (He., Ka., Sch. L.); der Patient Wi. fühlte sich unter der Therapie zumindest subjektiv besser. Bei den Patienten Br., Kr.W., Ge., Sch.K kam es zu keiner Besserung des Krankheitsbildes; zum Teil trat klinisch eine Verschlechterung ein. Bei den 8 untersuchten Kranken kam es in 5 Fällen (He., Ka., Kr.W., Sch.L., Wi.) unter der Behandlung zu einem signifikanten Abfall der DNS in den Paraleukoblasten. In 3 Fällen (Br., Ge., und Sch.K.) blieb der DNS-Gehalt unverändert oder stieg sogar an; klinisch hatte sich ihr Zustand verschlechtert.

2) Puri-Netholbehandlung:

Das Verhalten von Puri-Nethol auf den DNS-Gehalt in Paraleukoblasten konnten wir bei 5 Patienten, in 1 Fall (Sch.L.) sogar zweimal untersuchen. Bei 4 Patienten (He., Mü., Wi., Sch.L. bei der 1. Behandlung) wurden zusätzlich Steroide gegeben. Die Kranken Mü., Sch.L., He. und Kl. wiesen während der Therapie zumindest vorübergehend klinisch eine Besserung des Krankheitsbildes auf. Nicht auf die Behandlung sprach Wi. an. Zu einem Abfall des DNS-Gehaltes in den Paraleukoblasten kam es bei den Patienten Mü. und Sch.L. (beide klinisch gebessert). Unverändert blieb die DNS während den feulgenphotometrischen Kontrollmessungen bei Kl. sowie bei der 1. Puri-Netholbehandlung bei Sch.L., beide Patienten hatten auf die Behandlung angesprochen. Angestiegen war der DNS-Gehalt im Verlauf der Behandlung bei He. (klinische Besserung) und Wi. (klinisch keine Besserung).

3) Methotrexatbehandlung:

Bei 5 Patienten führten wir feulgenphotometrische Kontrollen des DNS-Gehaltes nach Methotrexatgabe (bei Wi. 2mal) durch. Bei den Kranken He. und Wi. lief gleichzeitig die Behandlung mit Steroiden und Puri-Nethol bzw. nur mit Steroiden weiter. Eine wesentliche klinische und hämatologische Besserung trat bei Fi.

und Kl. nicht ein; bei Wi. und He. verschlechterte sich der Zustand stark. Gut auf die Behandlung hatte die Patientin Kr.B. reagiert; es kam zur Teilremission, der DNS-Gehalt in den Paraleukoblasten fiel ab. Ebenfalls einen Abfall bei der Kontrollmessung zeigte Fi. (klinisch ohne wesentliche Besserung); die nachfolgenden Bestimmungen zeigten aber zum Teil starke Schwankungen. Bei den Patienten He., Kl., Wi. (alle ohne klinische und hämatologische Besserung des Krankheitsbildes) hatte sich der DNS-Gehalt in den Paraleukoblasten bei den Kontrollmessungen nach der Methotrexatbehandlung nicht verändert.

Name	Messung Tage nach Therapie- beginn	STP ⁺ oder p	DNS-Gehalt und Vertr. Grenze (für p = 0, 01)	p	Leuko- zyten	Blasten %	Kerndurch- messer und Vertr. Gr. (für p = 0, 01)	p
Br.	Vorwert	p	34,9 ± 0,97		174 000	89	10,4 ± 0,91	
	1.	p	34,4 ± 0,98	0,25	176 000	90	10,9 ± 0,68	0,165
	5.	p	36,5 ± 0,89	0,001	189 000	93	10,0 ± 0,7	0,008
Ge.	Vorwert	p	32,1 ± 0,87		163 000	77,5	10,6 ± 1,6	
	3.	p	32,6 ± 0,74	0,15	240 000	89	11,8 ± 1,6	0,1
He.	Vorwert	p	34,2 ± 0,7		160 000	96,2	10,2 ± 0,68	
	7.	p	33,1 ± 0,68	0,001	7 400	58	8,9 ± 0,51	0,001
	18.	p	34,8 ± 0,7	0,001	31 800	55	9,7 ± 0,65	0,02
Ka.	Vorwert	STP	35,8 ± 0,98		115 000	92	10,4 ± 2,0	
	10.	STP	31,9 ± 0,86	0,001	8 000	35	11,1 ± 2,6	0,5
Kr. W.	Vorwert	STP	37,8 ± 1,2		1 500	6	10,6 ± 0,78	
	26.	STP	34,7 ± 0,98	0,001	1 750	53	10,0 ± 0,64	0,07
++ Sch. K.	Vorwert	STP	35,1 ± 0,95		3 500	30	11,3 ± 0,9	
	8.	STP	35,8 ± 0,85	0,12	3 150	23	10,8 ± 0,8	0,19
	Vorwert	p	35,7 ± 0,86		1 465	29,5	10,4 ± 0,73	
	3.	p	37,7 ± 0,73	0,001	8 600	23	10,8 ± 1,1	0,37
Sch. L.	26.	p	37,3 ± 0,78	0,23	32 000	85	10,8 ± 0,88	1,0
	Vorwert	p	37,3 ± 0,87		10 000	36	9,9 ± 1,0	
	2.	p	38,0 ± 0,65	0,05	11 800	22	9,6 ± 0,8	0,46
	4.	p	37,8 ± 0,67	0,53	12 000	16	9,6 ± 0,8	1,0
Wi.	16.	p	36,7 ± 0,69	0,0025	8 000	22	9,7 ± 0,94	0,8
	Vorwert	p	36,8 ± 0,65		120 800	95,6	9,9 ± 0,7	
Wi.	3.	p	35,8 ± 0,75	0,003	63 400	92	10,2 ± 0,88	0,285
				0,3				0,785

+ STP = Sternalpunktat, p = peripheres Blut
 ++ akuter Schub einer chronisch-myeloischen Leukämie

Tabelle 4: Rel. DNS-Gehalt in AE, Kerndurchmesser und Vertrauensgrenzen
 (für p = 0, 01) der Paraleukoblasten vor und nach Gabe von Neben-
 nierenrindensteroiden (50 - 300 mg/d; s. Text).

Name	Messung Tage nach Therapie- beginn	STP ⁺ oder p	DNS-Gehalt und Vertr. Grenze (für p = 0,01)	p	Leuko- zyten	Blasten %	Kerndurch- messer und Vertr. Gr. (für p = 0,01)	p
He.	Vorwert 7	p p	34,8 ± 0,7 36,2 ± 1,0	0,001	31 800 30 000	55,5 54	9,7 ± 0,65 9,5 ± 0,68	0,5
Kl.	Vorwert 9	p p	36,3 ± 1,0 36,4 ± 0,83	0,801	47 000 28 000	48 30	10,1 ± 0,78 9,8 ± 0,77	0,39
Mü.	Vorwert 18	STP STP	33,1 ± 0,96 31,6 ± 0,61	0,001	3 950 4 200	27 18	10,7 ± 1,04 10,3 ± 0,86	0,34
Sch. L.	Vorwert 11	p p	36,7 ± 0,69 36,3 ± 1,28	0,365	10 300 12 500	22 15	9,7 ± 0,94 10,7 ± 1,35	0,04
	Vorwert 2	p	36,1 ± 0,65	0,229	10 600	20	10,1 ± 0,74	0,169
	7	p	35,6 ± 0,80	0,001	15 100	17	10,7 ± 1,2	0,421
	7	p	34,2 ± 0,8		5 200	14	10,3 ± 1,0	
Wi.	Vorwert 7	p p	34,8 ± 0,92 37,3 ± 1,1	0,001	12 250 15 000	56 76	10,0 ± 0,65 10,5 ± 0,85	0,139

+ STP = Sternalpunktat, p = peripheres Blut

Tabelle 5: Rel.DNS-Gehalt in AE, Kerndurchmesser und Vertrauensgrenzen
(für p = 0,01) der Paraleukoblasten vor und nach Gabe von Puri-
Nethol (50 - 300 mg/d; s. Text).

Name	Messung Tage nach Therapie- beginn	STP ⁺ oder p	DNS-Gehalt und Vertr. Grenze (für p = 0, 01)	p	Leuko- zyten	Blasten %	Kerndurch- messer und Vertr. Gr. (für p = 0, 01)	p
++ Fi.	Vorwert	p	36,1 ± 0,57		45 000	31	9,13 ± 1,1	
	6 Stunden	p	33,6 ± 1,07	0,001	37 000	35	9,40 ± 0,8	0,547
	9 Stunden	p	36,6 ± 1,77	0,001	39 000	35	9,40 ± 0,88	1,0
	1. Tag	p	34,4 ± 1,03	0,001	41 000	33	8,93 ± 0,63	0,130
	2. Tag	p	34,0 ± 0,95	0,401	36 000	35	9,5 ± 0,76	0,08
He.	Vorwert	STP	33,1 ± 0,63		48 900	66	10,4 ± 0,57	
	6	STP	33,5 ± 1,1	0,315	2 500	65	8,4 ± 1,0	0,001
Kl.	Vorwert	p	36,9 ± 0,69		57 000	40	10,3 ± 0,74	
	1	p	36,9 ± 0,82	1,0	43 000	36	9,7 ± 0,87	0,09
	5	p	36,1 ± 0,88	0,03	15 800	54	10,3 ± 0,81	0,115
Kr. B.	Vorwert	p	37,6 ± 0,77		44 000	91,5	10,4 ± 0,86	
	1	p	36,6 ± 0,96	0,0089	25 250	91	10,9 ± 0,82	0,130
	4	p	37,6 ± 0,6	0,0062	22 000	90	10,0 ± 0,89	0,021
	5	p	35,4 ± 0,58	0,001	7 500	87	9,2 ± 1,0	0,065
Wi.	Vorwert	p	35,0 ± 0,98		128 000	95,5	10,8 ± 0,9	
	1	p	35,0 ± 0,84	1,0	91 000	96	10,7 ± 0,85	0,8
	Vorwert	p	35,8 ± 0,75		63 000	92	10,2 ± 0,88	
	6	p	35,4 ± 0,92	0,3	75 000	93	10,1 ± 0,74	0,79

+ STP = Sternalpunktat, p = peripheres Blut

++ akuter Schub einer chronisch myeloischen Leukämie

Tabelle 6: Rel. DNS-Gehalt in AE, Kerndurchmesser und Vertrauensgrenzen
(für p = 0, 01) der Paraleukoblasten nach einmaliger Injektion von
20 bzw. 50 mg Methotrexat (s. Text).

Name	VOR STEROIDEN		NACH STEROIDEN	
	gemessene Zellzahl	% Anteil in DNS-Synth.	gemessene Zellzahl	% Anteil in DNS-Synth.
He. ⁺	50	0	100	2
Ka. ⁺	100	12	100	2
Sch. L. ⁺	50	0	150	0
Br. ⁺⁺	50	4	100	2
Ge. ⁺⁺	50	2	50	0
Kr. W. ⁺⁺	50	0	50	0
Sch. K. ⁺⁺	P 50	0	P 100	1
	STP 50	4	STP 50	0
Wi. ⁺⁺	50	2	50	0

⁺ = mit klinischer Besserung; ⁺⁺ = ohne klinische Besserung.

Tabelle 7: Proz. Anteil Paraleukoblasten in DNS-Synthesephase vor und nach der Behandlung mit Steroiden.

Name	VOR PURI-NETHOL		NACH PURI-NETHOL	
	gemessene Zellzahl	% Anteil in DNS-Synth.	gemessene Zellzahl	% Anteil in DNS-Synth.
He. ⁺	50	4	50	2
Kl. ⁺	50	0	50	0
Mü. ⁺	50	0	50	2
Sch. L. ⁺	50	0	50	2
Sch. L. ⁺	50	0	100	0
Wi. ⁺⁺	50	0	50	4

⁺ = mit klinischer Besserung; ⁺⁺ = ohne klinische Besserung.

Tabelle 8: Proz. Anteil Paraleukoblasten in DNS-Synthese vor und nach der Behandlung mit Puri-Nethol.

VOR METHOTREXAT			NACH METHOTREXAT	
Name	gemessene Zellzahl	% Anteil in DNS-Synth.	gemessene Zellzahl	% Anteil in DNS-Synth.
Kr. B. ⁺	50	2	150	0,6
Fi. ⁺⁺	100	6	200	2,5
He. ⁺⁺	50	2	50	0
Kl. ⁺⁺	50	2	100	0
Wi. ⁺⁺	50	0	50	0
Wi. ⁺⁺	50	0	50	0

⁺ = mit klinischer Besserung; ⁺⁺ = ohne klinische Besserung.

Tabelle 9: Proz. Anteil Paraleukoblasten in DNS-Synthese vor und nach der Behandlung mit Methotrexat.

Name	gemessene Zellzahl	% Anteil in DNS-Synth.
Fi.	100	6
He.	50	0
Kr. B.	50	2
Wi.	50	2

Tabelle 10: Proz. Anteil Paraleukoblasten in DNS-Synthese bei der Aufnahme bei unbehandelten Kranken.

Name	gemessene Zellzahl	% Anteil in DNS-Synth.
Br.	50	2
Ge.	50	2
Ka.	100	12
Kl.	50	0
Kr. W.	50	0
Mü.	50	0
Sch. K.	100	2
Sch. L.	50	0

Tabelle 11: Proz. Anteil Paraleukoblasten in DNS-Synthese bei der Aufnahme bei vorbehandelten Kranken.

Name	DNS-Gehalt im Sternalmark	DNS-Gehalt im peripheren Blut
Br.	$36,1 \pm 0,99$	$34,9 \pm 0,97$
He.	$33,2 \pm 0,66$	$34,2 \pm 0,70$
Wi.	$35,0 \pm 1,04$	$36,8 \pm 0,65$

Tabelle 12: Rel. DNS-Gehalt in AE. und Vertrauensgrenzen (für $p = 0,01$) in Paraleukoblasten des Sternalmarks und peripheren Blutes bei den gleichen Patienten.

Name	STP	P	Färbe-Nr.	DNS-Gehalt u. Vertr. Grenze (für p = 0,01)	auf Standard- präparat be- zog. DNS-Gehalt	Vorbe- handlung
Br.		+	A 31	34,9 ± 0,97	36,1	ja
Fi.		+	A 19	36,1 ± 0,57	37,4	nein
Ge.		+	A 15	32,1 ± 0,87	33,6	ja
He.		+	A 36	34,2 ± 0,70	35,2	nein
Ka.	+		A 13	35,8 ± 0,98	37,9	ja
Kl.		+	A 29	36,9 ± 0,69	38,4	ja
Kr. W.	+		A 31	37,8 ± 1,20	39,1	ja
Kr. B.		+	A 31	37,6 ± 0,77	38,9	nein
Mü.	+		A 30	33,1 ± 0,96	33,0	ja
Sch. K.	+		A 33	35,1 ± 0,95	36,0	
		+	A 33	35,7 ± 0,86	36,7	ja
Sch. L.		+	A 29	37,3 ± 0,87	38,5	ja
Wi.		+	A 21	36,8 ± 0,65	37,8	nein

Tabelle 13: Rel. DNS-Gehalt in AE. der Paraleukoblasten bei der Erst-
untersuchung. Zum Vergleich der Werte untereinander, wurde
der DNS-Gehalt auf ein Standardpräparat von 31,2 AE.
(Mittelwert aus den Färbungen A 40,43,44,45,46,47,48) be-
zogen.

DISKUSSION

Zur Untersuchung des DNS-Gehaltes in Paraleukoblasten bei Kranken mit einer Paraleukoblastenleukämie bzw. im akuten Schub einer chronisch myeloischen Leukämie wurden feulgenphotometrische Untersuchungen durchgeführt. Die Interpretation der Versuchsergebnisse hat unter der Voraussetzung Gültigkeit, daß die unter konstanten Bedingungen durchgeführte Feulgenfärbung eine Anfärbung in einem direkten Verhältnis zu der in der Zelle vorhandenen DNS ergibt (19, 28).

An Paraleukoblasten konnten wir dabei feststellen, daß das Gros der Zellen einen DNS-Gehalt aufwies, der in der Größenordnung normaler Granulozyten lag. Wir fanden in allen Fällen nur wenige Zellen, die einen wesentlich höheren DNS-Gehalt, als Zeichen einer in diesen Zellen ablaufenden DNS-Synthese, aufwiesen. Der Anteil dieser Zellen mit einem hohen DNS-Gehalt (Werte zwischen $2n$ und $4n$) betrug bei Ka. 12 % und lag bei den übrigen Patienten unter 6 % (Tab. 7 - 9). Diese Befunde entsprechen Untersuchungen nach H^3 -Thymidininkubation (37 - 40).

Der mittlere durchschnittliche DNS-Gehalt ruhender d.h. nicht in DNS-Synthese befindlicher, Paraleukoblasten zeigte bei einzelnen Kranken Abweichungen, die Folge aneuploider Stammlinien sein können (32, 34 - 36). Die Streubreite der DNS-Werte in den Paraleukoblasten war höher als in normalen Segmentkernigen. Bei 3 Kranken haben wir zur gleichen Zeit das STP und das periphere Blut untersucht und dabei Unterschiede im DNS-Gehalt zwischen den Paraleukoblasten im STP und in der Peripherie gefunden (s. Tab. 12). Es läßt sich nicht entscheiden, ob dies als Hinweis für das Vorliegen verschiedener Populationen angesehen werden muß, wobei die Paraleukoblasten in der peripheren Blutbahn aus extramedullären Bildungsstätten stammen können, oder ob dieser Befund auf eine Ausreifung oder Alterung innerhalb der gleichen Paraleukoblastenpopulation zurückzuführen ist.

Unter der Behandlung mit Steroiden sowie mit Antimetaboliten konnten wir zum Teil signifikante Unterschiede in der Feulgenanfärbung der Paraleukoblasten gegenüber der Kontrolluntersuchung vor Einleitung der Therapie nachweisen (Tab. 4 - 6). Die unterschiedliche Anfärbung kann durch das Vorhandensein aneuploider Stammlinien (s. o.) mit einer Änderung der absoluten DNS-Menge bedingt sein oder durch eine veränderte Anfärbbarkeit infolge einer Strukturänderung am DNS-Molekül verursacht werden (27).

Der Effekt der untersuchten Therapeutika auf den DNS-Gehalt bzw. die DNS-Anfärbbarkeit war unterschiedlich. Bei den 8 Kranken, die mit Nebennierenrindensteroiden (Prednisolon) behandelt wurden, fanden wir 5mal nach Einsetzen der Therapie eine Abnahme der Feulgenanfärbung der Paraleukoblasten. Da dieser Effekt schon nach 2 Tagen nachweisbar war, ist eine Änderung an der DNS der gleichen Paraleukoblasten durchaus möglich. Für die Annahme, daß in allen diesen Fällen eine neue Paraleukoblastenpopulation mit einem niedrigeren DNS-Gehalt aufgetreten wäre, bot die gleichbleibende Zellmorphologie keinen Anhalt. Eine Ausnahme machte nur der Patient He., bei dem innerhalb von 7 Tagen nach Beginn einer Steroidbehandlung (Abb. 4) die Leukozyten von 160 000 auf 7 400 abgefallen waren. Die in der Peripherie noch nachweisbaren Paraleukoblasten wiesen sowohl einen anderen DNS-Gehalt als auch eine geringere Zellgröße auf. Obwohl in allen Fällen, bei denen es unter Steroiden zu einer klinischen Besserung kam, der DNS-Gehalt in den Paraleukoblasten abfiel und bei den 3 Fällen ohne DNS-Änderungen das Krankheitsbild unbeeinflusst blieb, ist die Fallzahl zu gering, um aus diesen Befunden sichere Beziehungen aufzustellen.

Unter der Behandlung sowohl mit Puri-Nethol als auch mit Methotrexat ließ sich kein ähnlich einheitliches Verhalten des feulgenphotometrisch bestimmten DNS-Gehaltes wie nach der Steroidtherapie nachweisen. In einem Fall (Fi., Abb. 1) kam es dabei nach 6 und noch mehr nach 9 Stunden zu einer Zunahme der Streuung der DNS-Werte nach einmaliger Methotrexatgabe (20 mg). Möglicherweise könnte dies ein Hinweis für eine unterschiedliche Schädigung der Paraleukoblasten sein (Abhängigkeit vom Zellalter?). Nach 2 Tagen war die Streubreite der DNS-Werte wieder zurückgegangen. Morphologisch zeigten die Zellkerne eine Vielgestaltigkeit, die unter der Therapie mehr zu Gunsten eines etwas monotoneren Zellbildes verschwand, was sich auch in einer Abnahme der

Streubreite äußerte.

Ob es unter der Behandlung mit Steroiden oder Antimetaboliten zu einer Veränderung des Prozentsatzes der in DNS-Synthese befindlichen Paraleukoblasten kommt, ließ sich wegen den für diese Fragestellung zu geringen Zellzahlen weder im Einzelfall noch für alle mit Steroiden, Puri-Nethol und Methotrexat behandelten Kranken gemeinsam sichern. Wenngleich unter Steroiden und Methotrexat eine Abnahme des Anteils der in DNS-Synthese befindlichen Zellen vorzuliegen schien.

Bei den von uns untersuchten Kranken ließ sich bei der Erstuntersuchung kein Unterschied in dem prozentualen Anteil der Zellen in DNS-Synthesephase zwischen unbehandelten und vorbehandelten Patienten feststellen (10 und 11), (41).

ZUSAMMENFASSUNG

- 1) Bei 10 Kranken mit einer Paraleukoblastenleukämie und 2 Kranken mit einem Myeloblastenschub bei chronisch myeloischer Leukämie wurden feulgenphotometrische DNS-Bestimmungen in den Paraleukoblasten vor und während einer Therapie mit Steroiden, Puri-Nethol und Methotrexat durchgeführt. Die Untersuchungen wurden unter der Voraussetzung vorgenommen, daß die Feulgenfärbung eine Anfärbung in einem direkten Verhältnis zu der in der Zelle vorhandenen DNS ergibt.
- 2) Der DNS-Gehalt der Paraleukoblasten wich wenig von dem DNS-Gehalt normaler Granulozyten ab.
- 3) Bei 3 Kranken untersuchten wir sowohl Zellen aus dem STP als auch aus dem peripheren Blut. Der relative DNS-Gehalt in den Paraleukoblasten des STP und der peripheren Blutbahn war unterschiedlich.
- 4) Bei allen untersuchten Kranken mit Paraleukoblastenleukämie war der Anteil der Paraleukoblasten, der sich auf Grund eines höheren DNS-Gehaltes in DNS-Synthese befand, gegenüber normalen teilungsfähigen Granulozytenvorstufen vermindert.
- 5) Die Feulgenanfärbung der Paraleukoblasten sank unter der Behandlung mit Steroiden bei 5 von 8 Patienten signifikant ab. Die 3 Kranken, die keine Änderung aufwiesen sprachen nicht auf die Therapie an. Unter Methotrexat und Puri-Nethol (je 6 Fälle) waren die Befunde uneinheitlich.
- 6) Die Änderung der Feulgenanfärbung kann sowohl Hinweis auf einen wechselnden DNS-Gehalt der Paraleukoblasten sein als auch Folge einer veränderten Feulgenanfärbbarkeit der DNS unter der Therapie.

7) Eine sichere Änderung des prozentualen Anteils der in DNS-Synthesephase befindlichen Paraleukoblasten ließ sich unter der Behandlung mit Steroiden, Puri-Nethol und Methotrexat nicht nachweisen.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Métais, P. et P. Mandel:
Teneur an acide desoxypentosenucléique des leucocytes chez l'etat pathologique.
Compt. rend. Soc. Biol. (Paris), 144, 277 (1950)
- 2) Davidson, J.N., J. Leslie and J.C. White:
The nucleic acid content of the cell.
Lancet II, 1287 (1951)
- 3) Davidson, J.N., J. Leslie and J.C. White:
Quantitative studies on the content of nucleic acids in normal and leukemic cells from blood and bone marrow.
J. Path. Bact., 63, 471 (1951)
- 4) Menten, M.L. and Willms:
Nucleic acid content for cells of bone marrwo aspirated from patients with leukemia.
Cancer Res., 13, 733 (1953)
- 5) Hale, A.J. and S.J. Wilson:
The deoxyribonucleic acid content of leukocytes in normal and in leukemic human blood.
J. Path. Bact., 77, 605 (1959)
- 6) Hale, A.J. and S.J. Wilson:
The deoxyribonucleic acid content of the nuclei of leukemic leucocytes.
Lancet I, 577 (1960)
- 7) Marinone, G.:
Problèmes de cytochimie quantitative des cellules des organes hemopoiétiques.
Rev. Hémat., 9, 341 (1954)
- 8) Perugini, S., M. Soldati et O. Zampori:
Il contenuto nucleara di proteina istonica et di acido desossiribonucleico nelle cellule della leucosi mieloide.
Minerva Med. Tor., 49, 4771 (1958)
- 9) Petrakis, N.L.:
Microspectrophotometric estimation of the deoxyribonucleic acid (DNA) content of individual normal and leukemic human lymphocytes.
Blood, 8, 905 (1953)

- 10) Marinone, G. :
Il tenore cariologico die acido desossiribonucleico della cellule
linfatiche durante il loro processo di differenziazione.
Boll. Soc. ital. Biol. sper. 26, 1 (1950)
- 11) Gross, R., E. Grundmann, H. Brehmke, J. Kahlstorf und U. Bock:
Art und Intensität der Zellvermehrung bei akuten Leukosen.
Klin. Wschr., 40, 392 (1962)
- 12) Gross, R., E. Grundmann und H. Brehmke:
Zur Frage der Proliferation undifferenzierter leukämischer Zellen.
Fol. Haemat. N. F., 6, 357 (1961)
- 13) Hale, R.H. and E.H. Cooper:
DNA synthesis in infectious mononucleosis and acute leukemia.
Acta Haemat. (Basel), 29, 257 (1963)
- 14) Müller, D. :
Das Verhalten des Nukleinsäuregehaltes in Leukämiezellen unter cytosta-
tischer Behandlung.
Proc. III. Int. Congr. of Chemotherapie 1126 - 1130 (1963)
- 15) Caspersson, T. :
Über den chemischen Aufbau der Strukturen des Zellkerns.
Scand. Arch. physiol. 73, Suppl. 8 (1936)
- 16) Davern, G. Cairus, J. :
Nucleic acids and proteins.
Amer. J. Med. 34, 600 (1963)
- 17) Swift, H.H. :
Quantitative aspects of nuclear nucleoproteins.
Int. Rev. Cytol. 2, 1 (1953)
- 18) Swift, H.H. :
The desoxyribose nucleic acid content of animal nuclei.
Physiol. Zool. 23, 169 (1950)
- 19) Ris, H., A.E. Mirsky:
Quantitative cytochemical determination of desoxyribonucleic acid with
the Feulgen nuclear reaktion.
Z. gen. Physiol. 33, 125 (1949)
- 20) Sandritter, W., D. Müller und H.G. Schiemer:
Über den Nukleinsäuregehalt und das Trockengewicht von haploiden und
diploiden Zellen.
Verh. 55 Anat. Ges. Ffm. 146 (1958)
- 21) Sandritter, W., D. Müller und O. Gensecke:
Ultraviolett-mikrospektrophotometrische Messungen des Nukleinsäure-
gehaltes von Spermien und diploiden Zellen.
Acta histochem. (Jena) 10, 139 (1960)
- 22) Hilz, H., B. Hubmann, M. Oldekop, M. Scholz und M.V. Gosler:
Die Wirkung von Röntgenstrahlen und zytostat. Verbindungen auf den
DPN-Gehalt und DNS-Synthesen Ascitestumorzellen.
Biochem. Zschr. 336, 32 (1962)

- 23) Obrecht, P. und K.H. Strickstock:
Zur Frage der Wirkung alkylrierender Substanzen auf Desoxyribonukleinsäure in vivo.
Arzneim. Forsch. 12, 850 (1962)
- 24) Kersten, H. :
Einfluß von Mitomycin C auf den Desoxyribonukleinsäureabbau in ruhenden Bakterien.
Hoppe Seyler's Zschr. physiol. Chem. 329, 31 (1962)
- 25) Kersten, H. und H. Themann:
Morphologische und biochem. Veränderungen an Ascitestumorzellen der Maus nach Einwirkung von Mitomycin C.
Z. ges. exp. Med. 136, 209 (1962)
- 26) Presnova, J.F. :
Effect of thiophosphamide on the content of nucleic acids and activity of depolymerases in rats with transplantable tumors.
8 th. Int. Cancer Congr. Moscow 1962
- 27) Harbers, E. :
Die Nukleinsäuren
G. Thieme Verlag Stuttgart 1964
- 28) Feulgen, R., Rossenbeck, H. :
Mikroskopisch chemischer Nachweis einer Nukleinsäure vom Typus der Thyminukleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten.
Z. physiol. Chem. 135, 203 - 248 (1924)
- 29) Davidson, J.N. :
The biochemistry of the nucleic acids
Methuen u. CA. Ltd. 87 (1960)
- 30) Barka, T., Aderson, P.J. :
Histochemistry
Harper and Row, New York 1963
- 31) Koller, S. :
Graph. Tafeln zur Beurteilung stat. Zahlen.
Steinkopf Verlag Dresden u. Leipzig 1940
- 32) Nowell, P.C. and D.A. Hungerford:
Chromosomes studies on normal and leukemic cell populations.
Int. Rev. Dytol. 12, 69 (1961)
- 33) Ruffie, M.J. et A.M. Mourlan:
Sur les anomalies chromosomiques rencontrées au cours des Leucemies aigues.
IX. Congr. Int. Soc. Hemat. Mexiko 1962
- 34) Sandberg, A.A., J. Ischiarin, L.H. Grosswhite and T.S. Hauschka:
Chromosomal Dichotomy in blood and marrow of acute leukemia.
Cancer Res. 22, 748 (1962)

- 35) Sandberg, A.A., G.F. Koepf, L.H. Grosswhite and T.S. Hauschka:
The chromosome constitution of human marrow in various development
and blood disorders.
Amer. J. hum. Genet. 12, 231 (1960)
- 36) Müller, D.:
Desoxyribonukleinsäurebestimmungen in den Leukozyten.
Klin. Wschr. 42, 224 (1964)
- 37) Maurer, A.M. and v. Fisher:
In vivo study of cell kinetics in acute leukaemia.
Nature (Lond.) 197, 574 (1963)
- 38) Craddock, C.G. and G.S. Nakai:
Leukemic cell proliferation as determined by in vitro deoxyribonucleic
acid synthesis.
J. clin. Invest. 41, 360 (1962)
- 39) Craddock, Ch. G.:
Cellular proliferation in normal and leukemic states as reflected by in
vitro DNA-synthesis.
9th. Cong. Int. Soc. Haemat. Mexiko 1962
- 40) Killmann, S.A., E.P. Cronkite, V.P. Bond and T.M. Fliedner:
Proliferation of human leukemic cells studied with tritiated thymidine
in vivo.
Proc. Europ. Soc. Haemat. 8, 63 (1962)
- 41) Müller, D.:
Histochemische Untersuchungen an akuten und chronisch-myeloischen
Leukämien.
I. Die Proliferation der leukämischen Zellen.
Blut XII, 329 (1966)

Herrn Prof. Dr. H.E. Bock danke ich für die Überlassung
des Themas.

Für die Unterstützung bei der Ausarbeitung bedanke ich
mich bei Herrn Dr. D. Müller.

Ebenfalls danke ich meiner Braut, Frl. Brigitte Wenger,
für ihre Hilfe bei den Schreibarbeiten.

Lebenslauf

Am 4. Januar 1941 wurde ich, Werner Merz, als Sohn des Werkmeisters Ernst Merz und seiner Ehefrau Sofie, geb. Zerrweck, in Stuttgart-Bad Cannstatt geboren. 1947 trat ich in die Volksschule in Bad Cannstatt ein. Ab 1951 besuchte ich das Johannes-Kepler-Gymnasium und bestand 1960 die Reifeprüfung an dieser Schule. Für das Sommersemester 1960 schrieb ich mich bei der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen ein. Im April 1961 legte ich hier die naturwissenschaftliche Vorprüfung, im März 1963 die ärztliche Vorprüfung ab. Das erste klinische Semester studierte ich noch in Tübingen; das Wintersemester 1963/64 und das Sommersemester 1964 an der Universität München. Im Wintersemester 1964/65 kam ich wieder an die Universität Tübingen zurück und legte hier Ende Juli 1966 das Medizinische Staatsexamen ab.

